Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 1, Spring 2021, p. 109-122

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۱۲۲-۱۰۹

مقاله علمی- پژوهشی

اثر سطوح مختلف پودر پوسته تخم مرغ بر تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیری و قابلیت هضم جیره غذایی آلوده با آفلاتوکسین B_1 در شرایط برون تنی

رشید صفری[۱*]، ذبیح اله نعمتی[۲]، محمدرضا شیخلو[۱]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۰۶

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر سطوح مختلف پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین B_1 در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین بر تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک، قابلیت هضم ماده آلی و فراسنجه‌های تخمیری در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از آزمایش تولید گاز و شبیه‌سازی هضم شکمبه‌ی بود. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار در هر تیمار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- جیره پایه بدون متانول (شاهد بدون متانول)، ۲- جیره پایه با متانول (شاهد با متانول)، ۳- جیره پایه + متانول حاوی ۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین (آفلاتوکسین)، ۴- آفلاتوکسین + ۷ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ (سطح ۱)، ۵- آفلاتوکسین + ۷۵ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ (سطح ۲)، ۶- آفلاتوکسین + ۱۵۰ میلی‌گرم پوسته تخم‌مرغ (سطح ۳) بودند. نتایج آزمایش تولید گاز تا ۹۶ ساعت انکوباسیون نشان دهنده کاهش تولید گاز در تیمار آفلاتوکسین (فاقد جاذب توکسین) نسبت به تیمارهای شاهد (فاقد آفلاتوکسین) بود. این تغییر با این کاهش معنی‌دار در تجزیه‌پذیری ماه خشک و ماده آلی اندازه‌گیری شده و انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی تخمینی همراه بود. از طرفی افزودن سطوح مختلف پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین باعث بهبود در شرایط تخمیری شد که در تیمار سطح ۲ پوسته تخم مرغ معنی‌دار بود. به‌طوری‌که بین سطح ۲ پوسته تخم مرغ و تیمارهای شاهد (فاقد آفلاتوکسین B_1) تفاوت معنی‌داری در گاز تولیدی، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و انرژی خالص شیردهی، شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر مشاهده نشد. با در نظر گرفتن مجموعه نتایج حاصله می‌توان پوسته تخم مرغ را به عنوان جاذب آفلاتوکسین در شرایط شکمبه‌ای مدنظر قرار داد و جهت کاستن اثرات منفی آفلاتوکسین B_1 بر فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده مواد غذایی در شرایط شکمبه‌ای پیشنهاد داد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، پوسته تخم مرغ، تولید گاز، شاخص تفکیک‌پذیری، قابلیت هضم.

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها از نظر ساختاری متابولیت‌های تولیدی از قارچها می‌باشند که برای رشد قارچها ضروری نیستند و در قارچها تحت شرایط استرس تولید می‌شوند. مهمترین نوع مایکوتوکسین‌ها که تأثیر مضر بر سلامتی دارند آفلاتوکسین‌ها می‌باشند که عمدتاً توسط گونه‌های آسپرژیلوس تولید می‌شوند (۱۵). آفلاتوکسین‌ها، نسبت به سایر سموم قارچی به علت اثرات سرطان‌زایی و ایجاد مسمومیت حاد از اهمیت بیشتری برخوردار هستند(۴). بیش از۲۰ نوع از مولکول‌های آفلاتوکسین شناسایی شده است که مهمترین آن‌ها، آفلاتوکسین M_2،M_1،G_2،G_1،B_2،B_1 هستند (۳۲، ۲). علوفه‌ها، غلات، مواد پروتئینی مانند پنبه‌دانه منابع بالقوه آفلاتوکسین‌ها در جیره نشخوارکنندگان هستند. به‌طورکلی به دلیل توانایی اکوسیستم شکمبه‌ای نشخوارکنندگان در خنثی‌سازی و یا تبدیل آفلاتوکسین‌ها به ترکیباتی با تأثیر سمی کمتر، نشخوارکنندگان نسبت به سایر حیوانات حساسیت کمتری به آفلاتوکسین‌ها دارند. ولی نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که نشخوارکنندگان نیز مانند سایر

۱- استادیار، گروه علوم دامی،دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: rashid.safari@gmail.com)
Doi:10.22067/ijasr.2021.38309.0

حیوانات به وسیله آفلاتوکسین‌ها تحت تأثیر قرار می‌گیرند. از طرفی تحقیقات نشان داده است زمانی که دوز آفلاتوکسین B_1 به ۲۰۰-۸۰۰ میکروگرم در کیلوگرم جیره می‌رسد می‌تواند تحرکات شکمبه‌ای را کاهش دهد (۲۰) به‌طوری‌که تحقیقات نشان دهنده کاهش هضم سلولز در سطوح بالاتر از ۲۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در هر میلی‌لیتر در آزمایش‌های هضمی درون آزمایشگاهی است (۱۲) . از این‌رو آفلاتوکسین B_1 باعث کاهش هضم شکمبه‌ای، کاهش تولید و در مقادیر بالا باعث آسیب‌های کبدی و مرگ حیوان می‌شوند (۲۰). توکسین‌های هضم شده همراه غذا و یا متابولیت‌های حاصله از آن‌ها وارد بدن دام شده و در شیر و بافت‌ها تجمع می‌یابند هرچند که این مقدار کمتر از یک درصد توکسین‌های مصرفی دام است (۱۴). زمانی که توکسین‌ها در خوراک دام تشکیل می‌شوند مقاوم به روش‌های معمول عمل‌آوری خوراک مانند آسیاب کردن، حرارت دادن و سیلاژ کردن هستند (۳). امروزه انواع روش‌های شیمیایی، بیولوژیکی و فیزیکی برای کنترل آفلاتوکسین‌ها، به حداقل رساندن تولید آفلاتوکسین‌ها در قبل یا بعد از برداشت محصول، کمک به رفع آلودگی و یا سم‌زدایی آفلاتوکسین‌ها از مواد غذایی و خوراک آلوده و یا مهار جذب آفلاتوکسین‌ها در دستگاه گوارش توسعه یافته است (۶). یکی از رویکردهای جدید برای کاهش حضور آفلاتوکسین‌ها در خوراک، کاهش زیست فراهمی از طریق گنجاندن عوامل سم‌زدایی آفلاتوکسین‌ها در خوراک می‌باشد (۲۸). از مواد جاذبی که می‌توان مورد استفاده قرار داد، پوسته تخم مرغ است. پوسته تخم مرغ از کلسیم هیدروکسی آپاتیت تشکیل شده و محصول فرعی حاصل از کارخانه‌های تولید پودر تخم مرغ است. تحقیقات نشان داده است که پوسته تخم مرغ دارای ساختاری متخلخل است و از طرفی دارای مقادیر قابل توجهی کربنات کلسیم خالص است که توانایی جذب سموم مختلف را دارا است (۲۶). به دلیل اطلاعات محدود در رابطه با توانایی پودر پوسته تخم مرغ در جذب آفلاتوکسین در دستگاه گوارش، مطالعه حاضر در راستای بررسی تأثیر افزودن پودر پوسته تخم مرغ در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین B_1 بر فراسنجه‌های تخمیری و قابلیت هضم شکمبه‌ای و تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

مکان انجام آزمایش و تیمارها

این آزمایش در آزمایشگاه گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز انجام گردید. ترکیب جیره پایه مورد استفاده در این آزمایش در جدول ۱ نشان داده شده است. مقدار آفلاتوکسین و سطوح مختلف جاذب آفلاتوکسین در تیمارهای آزمایشی بر اساس تحقیقات صورت گرفته بر روی آفلاتوکسین و سطوح موثر جاذب آفلاتوکسین انتخاب گردید (۲۸، ۲۴، ۲۳). تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- جیره پایه بدون متانول (شاهد بدون متانول)، ۲- جیره پایه با متانول (شاهد با متانول)، ۳- جیره پایه + متانول حاوی ۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین (آفلاتوکسین)، ۴- آفلاتوکسین + ۷ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ (سطح ۱)، ۵- آفلاتوکسین + ۷۵ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ (سطح ۲)، ۶- آفلاتوکسین + ۱۵۰ میلی‌گرم پوسته تخم‌مرغ (سطح ۳) بودند.

روش تهیه آفلاتوکسین

برای تولید آفلاتوکسین مورد نیاز برای انجام آزمایش، سویه استاندارد قارچ *Aspergillus Parasiticus NRLL 2999* به مقدار یک ویال تهیه و در محیط آزمایشگاهی و به روش درون شیشه‌ای تحت شرایط استریل، بر روی محیط کشت دکستروز آگار حاوی سیب‌زمینی (*potato dextrose agar*) کشت گردید. مقدار ۲ سی-سی از سوسپانسیون اسپور با غلظت $۶/۵ \times ۱۰^{۶}$ از رشد قارچها تهیه و به داخل فلاسکی که حاوی محیط کشت استریل بود، افزوده شد(۲۲). محیط کشت تلقیح شده با اسپور قارچی به مدت ۵ روز و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، در داخل انکوباتور شیکردار قرار داده شد. محیط کشت تهیه شده در آون خشک و سپس میزان آفلاتوکسین B_1 آن به روش کروماتوگرافی با عملکرد بالا اندازه‌گیری شد (۲۱،۲۳). غلظت انواع آفلاتوکسین تولیدی در محیط کشت در جدول ۲ آورده شده است که حاوی ۲۵۰/۹ میلی‌گرم در کیلوگرم آفلاتوکسین B_1 بود. مقادیر مورد نیاز آفلاتوکسین با توجه به سطوح آن در تیمارهای آزمایشی در اتانول حل و به ویال‌ها افزوده شد.

آزمون تولید گاز

از روش منک و استینگاس برای تولید گاز در آزمایشگاه و شبیه‌سازی محیط شکمبه استفاده گردید (۱۹). برای این منظور مایع شکمبه مورد استفاده در این آزمایش، از ۳ رأس گوسفند نر نژاد مغانی فیستوله‌گذاری شده به وزن ۳ ± ۴۶ کیلوگرم قبل از تغذیه صبحگاهی تهیه شد. دام‌های مورد استفاده به مدت ۱۵ روز با جیره آزمایشی پایه (جدول ۱) در دو وعده صبح و عصر در حد نیاز نگهداری تغذیه شده بودند. مایع شکمبه با عبور دادن از پارچه متقال چهار لایه

صاف و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد در حمام بن ماری تا رسیدن به آزمایشگاه نگهداری شد (۱). بزاق مصنوعی به روش مک‌دوگال و در شرایط آزمایشگاهی و بی‌هوازی تولید و در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۳۳). سپس مایع شکمبه و بزاق مصنوعی با نسبت ۱ به ۲ مخلوط گردید. پس از آسیاب کردن مواد خوراکی با قطر منافذ ۱ میلی‌متری، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه خوراکی در درون ویال‌های شیشه‌ای ۱۲۵ میلی‌لیتری ریخته و تیمارهای آزمایشی حاوی سطوح مختلف پوسته تخم مرغ و سطح ۸۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین به داخل ویال‌ها افزوده شد و در ادامه مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بزاق مصنوعی و مایع شکمبه داخل هر ویال ریخته شد. در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲، ۸۴، ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون، فشار گاز تولیدی در ۴ تکرار برای هر تیمار آزمایشی توسط فشار سنج اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره پایه مورد استفاده (درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredient and chemical composition of basal diet (% dry matter) (NRC, 2007)

اجزا Ingredients	درصد ماده خشک % dry matter
یونجه خشک Alfalfa	50
دانه جو Barley grain	31.5
دانه ذرت Corn grain	3
سبوس گندم Wheat bran	6
کنجاله سویا Soybean meal	6
مکمل مواد معدنی و ویتامینی[1] Mineral and vitamin supplements[1]	1
دی کلسیم فسفات Di-calcium phosphate	1
نمک Salt	0.5
کربنات کلسیم Calcium carbonate	1
Chemical composition	%
ماده خشک Dry matter	92
ماده آلی Organic matter	89.77
پروتئین خام Crude protein	14.9
عصاره اتری Ether Extract	2.73
فیبر نامحلول در شوینده خنثی NDF	25
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی ADF	21.36
خاکستر Ash	10.23

[1] هر کیلوگرم از مکمل ویتامین و مواد معدنی حاوی ۹۹/۲ میلیگرم منگنز، ۵۰ میلی گرم آهن، ۸۴/۷ میلی گرم روی، ۱۰ میلی گرم مس، ۰/۲ میلی گرم سلنیوم، ۹۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D و ۱۸ بین‌المللی ویتامین E می‌باشد.

[1]Each kilogram of vitamin and mineral supplement contains 99.2 mg manganese, 50 mg iron, 84.7 mg zinc, 10 mg copper, 0.2 mg selenium, 900 IU of vitamin A, 2000 IU units of vitamin D and 18 IU of vitamin E

جدول ۲- غلظت انواع آفلاتوکسین در محیط کشت تولید شده (میلی‌گرم در کیلوگرم)
Table 2- Concentration of different type of Aflatoxin in produced culture

مورد Item	آفلاتوکسین Aflatoxin				
	آفلاتوکسین B1 Aflatoxin B1	آفلاتوکسین B2 Aflatoxin B2	آفلاتوکسین G1 Aflatoxin G1	آفلاتوکسین G2 Aflatoxin G2	آفلاتوکسین کل Total Aflatoxin
غلظت در محیط کشت (میلی‌گرم در کیلوگرم) concentration in Media culture (mg/kg)	250.9	107.4	-	50.7	409

لازم به ذکر است ۴ تکرار دیگر از هر تیمار تا زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون شد و برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تصحیح گاز تولید شده از ذرات معلق موجود در مایع شکمبه ۴ تکرار به عنوان بلنک در نظر گرفته شد. حجم خالص گاز تولیدی از هر ویال توسط معادله خط برازش شده برای دستگاه فشار سنج محاسبه شد (۱۷). تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق معادله ارسکوف و مکدونالد انجام شد:

$P= b\ (1-e^{-ct})$ معادله (۱)

در این معادله P حجم گاز تولیدی در مدت زمان t (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک) و c ثابت نرخ تولید گاز، b: کل گاز تولید شده از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر) و t مدت زمان انکوباسیون است (۲۵).

برای تخمین انرژی قابل متابولیسم (ME) از روش (معادله ۲) منک و استینگاس (۱۹) و انرژی خالص شیردهی (NE_L) و قابلیت هضم ماده آلی (DOM) از روش (معادله ۳و ۴) منک و همکاران (۱۸) و جهت برآورد میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFAs) از رابطه (معادله ۵) حاصل از تحقیقات گتاچیو و همکاران (۷) استفاده شد.

$ME\ (MJ/kg\ DM) = 0.157\times GP + 0.0084 \times CP + 0.022 \times EE - 0.0081 \times Ash + 1.06$ معادله (۲)

$NE_L\ (MJ/kg\ DM) = 0.115\times GP + 0.0054\times CP + 0.014\times EE - 0.0054\ Ash - 0.36$ معادله (۳)

$DOM\ \% = 0.9991\times GP+0.0595\times CP+0.0181\times Ash+9$ معادله (۴)

$SCFAs\ (mmol) = -0.00425 + GP \times 0.0222$ معادله (۵)

در این روابط GP تولید خالص گاز در ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، CP پروتئین خام (برحسب درصد)، Ash: مقدار خاکستر (برحسب درصد) می‌باشد.

تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی ماده خشک، ماده آلی و تعیین

عامل تفکیک

در ساعت ۲۴ انکوباسیون چهار تکرار از هر تیمار آزمایشی از بن ماری خارج گردید و سریعاً pH آن‌ها توسط pH متر اندازه‌گیری (Hi 2211-Hanna Instruments – USA) شد. جهت خروج کامل اجرام باکتریایی و به دست آوردن مقادیر ماده خشک تجزیه نشده در هر بطری، محتویات آن‌ها، سه بار به‌وسیله شوینده خنثی شسته شد و با استفاده از کاغذ صافی بدون خاکستر صاف و باقی‌مانده در آون و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید (۳۴). از کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت، برای اندازه‌گیری مقادیر خاکستر مواد تجزیه نشده، استفاده شد.

به‌منظور اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی از روش اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۳۰ نانومتر استفاده شد. به‌طوری‌که ۰/۰۵ گرم نمونه را با ۲/۵ میلی‌لیتر فنیل و ۲ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت ترکیب و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه انکوبه کرده و پس از خنک شدن، جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی میزان جذب نمونه‌ها توسط اسپکتوفتومتر قرائت شد (۳۰).

به‌منظور تعیین عامل تفکیک‌پذیری (Partitioning factor) که به‌صورت میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی بیان می‌شود از رابطه (معادله ۶) ارائه شده به‌وسیله ورکوا و همکاران استفاده شد (۱۶).

$PF=OMDe/IVGP=c-(a-b)/\ GP$ معادله (۶)

در این معادله c ماده آلی وزن شده در هر بطری (میلی‌گرم)، a مقدار مواد تجزیه نشده در هر بطری (میلی‌گرم)، b مقدار خاکستر مواد تجزیه نشده در هر بطری (میلی‌گرم)، و GP گاز تولیدی است.

به‌منظور تخمین مقادیر توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی از رابطه ارائه شده توسط ماکار (معادله ۷) استفاده گردید (۱۶).

$MM\ (mg)=[c-(a-b)]-[NG_{ml}\times k]$ معادله (۷)

که در این رابطه MM میلی‌گرم توده میکروبی تولید شده، NG میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی، K ضریب استوکیومتری و مقدار آن ۲/۲ می‌باشد.

داده‌های حاصل از این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با مدل آماری ارائه شده (معادله ۸) با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ مورد آنالیز قرار گرفتند (۲۹) و برای مقایسات میانگین، از آزمون دانکن با سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ استفاده شد.

معادله (۸) $Yij = \mu + Ti + eij$

در این مدل Yij نشان دهنده مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، Ti اثر تیمار، eij خطای آزمایش می‌باشد.

نتایج و بحث

تأثیر افزودن سطوح مختلف پوسته تخم مرغ به‌عنوان جاذب توکسین در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین B_1 بر فراسنجه‌های تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده کاهش تولید گاز در تیمار حاوی آفلاتوکسین (فاقد جاذب توکسین) نسبت به تیمارهای فاقد آفلاتوکسین بود به‌طوری‌که، میزان تولید گاز از ۲۹۵/۰۵ و ۲۹۴/۳۸ (میلی‌لیتر به ازای گرم ماده خشک) در تیمارهای شاهد حاوی متانول و بدون متانول به ۲۲۸/۴۸ (میلی‌لیتر به ازای گرم ماده خشک) کاهش یافت ($P<0/05$). از طرفی همزمان با کاهش در تولید گاز در این تیمار کاهش معنی‌دار در تجزیه‌پذیری ماه خشک و ماده آلی نسبت به تیمارهای شاهد فاقد آفلاتوکسین مشاهده شد که این کاهش به وجود آفلاتوکسین با سطح بالا در جیره نسبت داده می‌شود؛ به‌طوری‌که، تحقیقات محققان نشان داده است سطوح بالای آفلاتوکسین با تأثیر بر هضم شکمبه‌ای و میکروارگانیسم‌های شکمبه باعث کاهش در تجزیه‌پذیری ماه خشک و ماده آلی می‌شود (۱۰) که این کاهش در میزان تولید گاز نمود یافته و باعث کاهش تولید گاز حاصل از تخمیر میکروبی می‌گردد (۲۰). از طرفی برخی تحقیقات کاهش معنی‌دار در تولید گاز حاصل از انکوباسیون آزمایشگاهی را مشاهده نکرده‌اند و تغییرات در تولید گاز را به‌صورت کاهش عددی بیان کرده و عدم کاهش معنی‌دار را به سطوح پایین آفلاتوکسین B_1 مورد استفاده و توانایی میکروارگانیسم‌ها در خنثی‌سازی آن نسبت داده‌اند (۸).

در آزمایش حاضر افزودن سطوح ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم پودر پوسته تخم مرغ در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین به‌طور معنی‌داری باعث افزایش میزان تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی ماده خشک و ماده آلی گشت که این تغییرات در افزایش معنی‌دار میزان گاز تولیدی نیز نمود پیدا کرد ولی سطح ۷/۵ میلی‌گرم پودر پوسته تخم مرغ نتوانست تأثیر منفی آفلاتوکسین بر تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی و به دنبال آن کاهش تولید گاز را از بین ببرد و تفاوت معنی‌داری بین سطح یک پودر تخم مرغ و تیمار آفلاتوکسین مشاهده نشد و تغییرات صرفاً به‌صورت عددی بود. از طرفی اگرچه افزودن سطوح مختلف پودر پوسته تخم مرغ در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین B_1 باعث بهبود در تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در شرایط آزمایشگاهی گشت ولی همچنان مقادیر به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای شاهد فاقد آفلاتوکسین بود.

از طرفی افزایش مقادیر پوسته تخم مرغ از ۷۵ میلی‌گرم در تیمار سطح ۲ به ۱۵۰ میلی‌گرم در تیمار سطح ۳ باعث تغییرات معنی‌دار در گاز تولیدی، تجزیه‌پذیری ماده آلی و ماده خشک نشد که نشان از عملکرد بهینه تیمار حاوی سطح ۲ پوسته تخم مرغ به‌عنوان جاذب آفلاتوکسین و عدم تأثیر افزایش سطح ماده جاذب بر جذب بیشتر آفلاتوکسین B_1است. به‌طوری‌که تحقیقات جیانگ و همکاران (۱۳) نشان داده است که راندمان جذب آفلاتوکسین در جیره‌های حاوی ماده جاذب توکسین وابسته به دوز آفلاتوکسین و مقادیر ماده جاذب مورد استفاده در جیره غذایی گاوهای شیری است.

الگوی تولید گاز در طول ۹۶ ساعت انکوباسیون آزمایشگاهی برای جیره‌های حاوی آفلاتوکسین با سطوح مختلف پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب توکسین در شکل ۱ نشان داده شده است. مطابق با منحنی‌ها ۶ ساعت اول انکوباسیون تفاوت معنی‌داری در گاز تولیدی بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد از ۶ ساعت تا ۳۶ ساعت تیمارهای شاهد (فاقد آفلاتوکسین) به‌طور معنی‌داری از تیمارهای حاوی آفلاتوکسین گاز بیشتری تولید کردند ولی از ساعت ۴۸ انکوباسیون تولید گاز تیمارهای حاوی سطوح ۲ و ۳ پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین افزایش یافت به‌طوری‌که از نظر آماری تفاوت معنی‌دار با تیمار آفلاتوکسین مشاهده شد و با تیمارهای فاقد آفلاتوکسین تفاوت معنی‌داری نداشتند. نتایج این بخش نشان‌دهنده تأثیر مثبت افزودن پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین در دو سطح ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم است. تأثیر آفلاتوکسین B_1 و پوسته تخم مرغ به‌عنوان جاذب بر فراسنجه‌های تخمیری شکمبه (جدول ۴) نشان داد که تیمار آفلاتوکسین به‌طور معنی‌داری انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر پایین‌تری از تیمارهای شاهد فاقد آفلاتوکسین داشت که این کاهش به دنبال کاهش معنی‌دار در قابلیت هضم ماده آلی رخ داد.

جدول ۳- تأثیر پودر پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین بر گاز تولیدی و نرخ تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین B_1 شرایط آزمایشگاهی[۱]

Table 3- Effect of egg shell powder as Aflatoxin (AF) binder on gas production (GP) and gas production rate (GPR), DMD and OMD *in vitro*[1]

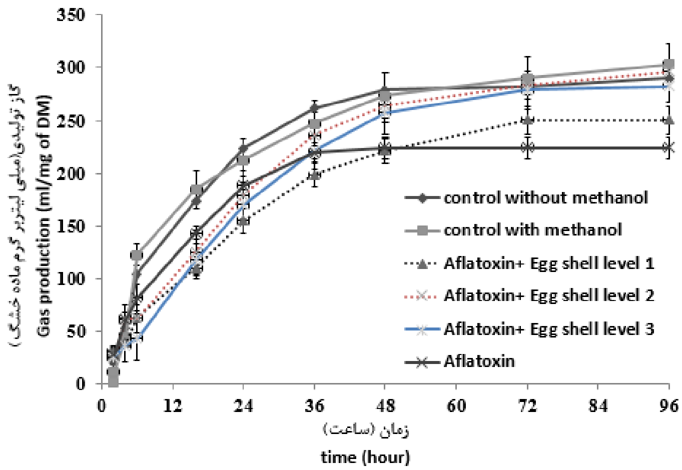
مورد Case	تیمارهای آزمایشی[۲] Experimental treatments[2]							
	شاهد بدون متانول Control without methanol	شاهد با متانول control with methanol	آفلاتوکسین Aflatoxin	سطح ۱ پوسته تخم مرغ Egg shell level 1	سطح ۲پوسته تخم مرغ Egg shell level 2	سطح ۳پوسته تخم مرغ Egg shell level 3	میانگین اشتباه استاندارد SEM	سطح معنی‌داری p-value
نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر/گرم ماده خشک/ساعت) Gas production rate (ml/g DM/h)	0.057[abc]	0.059[ab]	0.070[a]	0.042[cd]	0.044[bcd]	0.035[d]	0.0054	<0.001
کل تولید گاز (میلی‌لیتر/گرم ماده خشک) Total gas production (ml/g DM)	295.05[a]	294.38[a]	228.48[b]	252.70[b]	301.96[a]	302.97[a]	14.12	0.001
تجزیه‌پذیری ماده آلی (درصد) OM degradability (%)	74.96[a]	71.89[a]	44.87[c]	42.34[c]	59.46[b]	59.01[b]	2.97	<0.001
تجزیه‌پذیری ماده خشک (درصد) DM degradability (%)	58.84[a]	55.50[a]	29.17[c]	37.33[bc]	40.50[b]	39.83[b]	3.08	<0.001

[۱] تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

[۲] تیمارها شامل: تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه)، سطح۱ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۷ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، سطح۲ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۷۵ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، سطح۳ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۱۵۰ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک).

[1] Means within the same row with different superscripts differ (P< 0.05).

[2] Treatments consist of, control with methanol, control without methanol, Aflatoxin (800 ng/mg of rumen fluid), egg shell powder level 1 (Aflatoxin+ 7mg egg shell powder /200 mg of diet), egg shell level 2 (Aflatoxin +75mg egg shell powder /200 mg of diet), egg shell level 3 (Aflatoxin + 150 mg egg shell powder /200 mg of diet).



شکل ۱– منحنی تولید گاز در ساعت‌های مختلف انکوباسیون در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین با سطوح مختلف پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب توکسین. تیمارها شامل کنترل بدون متانول و کنترل با متانول، آفلاتوکسین (حاوی ۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه و بدون جاذب آفلاتوکسین)، تیمارهای آلوده به آفلاتوکسین و حاوی سطوح ۷/۵، ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم جاذب آفلاتوکسین به ترتیب سطح ۱، سطح ۲ و سطح ۳.

Figure 1- Gas production carves of diets contaminated with aflatoxin and contain of different levels of egg shell powder as toxin bander during ancubation times. Treatments were control with methanol, control without methanol, Aflatoxin (800 ng/mg of rumen fluid without aflatoxin binder), contaminated treatments with Aflatoxin and consist of 7.5, 75 and 150 mg aflatoxin binder as level 1, level 2 and level 3, respectively.

تحقیقات وست لاک و همکاران (۳۴) و مجتهدی و همکاران (۲۰) نیز کاهش معنی‌دار در قابلیت هضم ماده خشک در شرایط آزمایشگاهی را گزارش و آن را به وجود آفلاتوکسین و تأثیر آن بر جمعیت میکروبی محیط کشت نسبت داده‌اند. تیمار حاوی سطح ۲ پوسته تخم مرغ از نظر انرژی قابل متابولیسم تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد حاوی متانول و از نظر انرژی خالص شیردهی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تفاوت معنی‌داری با هر دو تیمار شاهد نداشت. از طرفی تیمار سطح ۱ از نظر آماری انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر بالاتری نسبت به تیمار آفلاتوکسین داشت که نشان از عملکرد مثبت پوسته تخم مرغ در سطح ۷۵ میلی‌گرم به عنوان جاذب آفلاتوکسین است. ولی در مقادیر پایین پوسته تخم مرغ (تیمار سطح ۱) قابلیت هضم ماده آلی و به دنبال آن انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمارهای شاهد بود و اختلاف معنی‌داری با تیمار حاوی آفلاتوکسین نداشت که نشان از مقادیر ناکافی پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین است. در تیمار حاوی سطح ۳ پوسته تخم مرغ مقادیر اسیدهای چرب کوتاه زنجیر ، انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی و قابلیت هضم ماده آلی کاهش معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد داشتند که احتمالاً بدلیل مقادیر بیش از حد پوسته تخم مرغ در این تیمار است.

به‌طوری‌که محققان کاهش در قابلیت هضم جیره غذایی و به دنبال آن عدم دسترسی دام به انرژی حاصل از خوراک در اثر مقادیر بالای مواد جاذب آفلاتوکسین را حاصل تداخل و از دسترس خارج کردن مواد مغذی و معدنی خوراک به وسیله سطوح بالای این مواد بیان کرده‌اند (۵) که در انکوباسیون میکروبی باعث کاهش در قابلیت هضم ماده آلی و در پی آن کاهش انرژی قابل متابولیسم، انرژی خالص شیردهی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر گشته است.

جهت ارزیابی فعالیت تخمیری شکمبه حاصل از جیره‌های غذایی می‌توان از دو شاخص، غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و نیتروژن آمونیاکی استفاده کرد (۹). اسیدهای چرب زنجیر تولید شده در تیمارهای شاهد (۱/۰۴۴ میلی مول بر گرم ماده خشک) و شاهد همراه با متانول (۱/۰۹ میلی مول بر گرم ماده خشک) در مقایسه با تیمار آفلاتوکسین (۰/۸۹ میلی مول بر گرم ماده خشک) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (جدول ۴) که بیانگر تأثیر منفی آفلاتوکسین موجود در جیره غذایی بر توده میکروبی محیط کشت است که باعث کاهش جمعیت میکروارگانیسم‌ها و در نتیجه کاهش تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر به عنوان محصول نهایی حاصل از تخمیر میکروبی گشته است. به‌طوری‌که در تحقیقات گالو و همکاران کاهش در تولید اسیدهای چرب فرار و حرکات شکمبه در اثر تیمارهای حاوی آفلاتوکسین بیان شده است (۶).

همچنین جیونگ و همکاران در گزارش خود علاوه بر کاهش در قابلیت هضم ماده خشک در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین B_1 ، کاهش در تولید اسیدهای چرب فرار را نیز گزارش کردند که تأییدکننده یافته‌های تحقیق حاضر است (۱۱). افزودن سطوح متفاوت پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین نتایج مختلفی را برای اسیدهای چرب فرار تولید شده نشان داد به‌طوری‌که در سطح ۱ تقریباً برابر با تیمار آفلاتوکسین بود که نشان از عدم کارایی مناسب این سطح از جاذب در جیره است ولی در سطح ۲ پوسته تخم مرغ تأثیر بهینه جاذب آفلاتوکسین در تولید اسیدهای چرب فرار مشاهده شد که باعث افزایش معنی‌دار اسیدهای چرب فرار تولید شده نسبت به تیمار آفلاتوکسین گشت (۱/۰۲۶ در مقابل ۰/۸۹ میلی مول بر گرم ماده خشک) که نتایج تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی (جدول ۳) و انرژی قابل متابولیسم انرژی خالص شیردهی و قابلیت هضم ماده آلی (جدول ۴) نیز تأیید کننده این افزایش هستند. سطح ۳ پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین کاهش معنی‌دار تولید اسیدهای چرب فرار نسبت به تیمارهای شاهد داشت که نشان از مقادیر بیش از حد پوسته تخم مرغ است که می‌تواند به وسیله از دسترس خارج شدن مواد مغذی و معدنی خوراک به وسیله سطح بالای مواد جاذب توضیح داده شود (۵).

غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای شاهد و تیمارهای حاوی هر سه سطح پوسته تخم مرغ به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار آفلاتوکسین است که نشان از تأثیر آفلاتوکسین بر فلور میکروبی محیط کشت و تغییرات در غلظت نیتروژن آمونیاکی است. با توجه به اینکه میکروارگانیسم‌های شکمبه پروتئین وارد شده به شکمبه را مورد تجزیه قرار می‌دهند و از طرفی غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر میزان تجزیه منابع پروتئینی جیره غذایی و استفاده از منابع نیتروژنی جهت ساخت پروتئین میکروبی است، لذا در صورتی که میکروارگانیسم‌های شکمبه تحت تأثیر آفلاتوکسین قرار بگیرند به‌گونه‌ای می‌توان اذعان داشت که متابولیسم پروتئین جیره نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد و در نتیجه غلظت نیتروژن آمونیاکی تغییر پیدا می‌کند (۲۷). در آزمایش حاضر بالا بودن غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمار آفلاتوکسین بیانگر تأثیر منفی آفلاتوکسین بر عملکرد میکروارگانیسم‌ها و عدم عملکرد مناسب میکروارگانیسم‌ها در تبدیل نیتروژن آمونیاکی تولید شده به پروتئین میکروبی است که با کاهش معنی‌دار در توده میکروبی تولیدی و همچنین راندمان سنتز میکروبی تیمار حاوی آفلاتوکسین (جدول ۵) نمود یافته است. تأثیر آفلاتوکسین B_1 و پوسته تخم مرغ به‌عنوان جاذب بر شاخص تفکیک پذیری، توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان دهنده کاهش معنی‌دار شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و همچنین راندمان سنتز میکروبی در تیمار آفلاتوکسین نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی است. با توجه به این کاهش معنی‌دار می‌توان به تأثیر منفی آفلاتوکسین بر جمعیت میکروبی محیط انکوباسیون و کاهش در سنتز پروتئین میکروبی حاصل از فعالیت میکروارگانیسم‌ها پی برد که با کاهش در قابلیت هضم ماده آلی و به دنبال آن کاهش در تولید اسیدهای چرب فرار در این تیمار آزمایشی (جدول ۴) همراه بوده است. تحقیقات تاپیا و همکاران (۳۱) نیز کاهش در هضم ماده خشک و تولید اسیدهای چرب در اثر کاهش جمعیت باکتریایی را گزارش و بیان کرده‌اند که این کاهش باعث کاهش معنی‌دار در تولید پروتئین میکروبی و افزایش معنی‌دار در جریان نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین در انکوباسیون شکمبه‌ای شده است. از طرفی افزودن سطوح مختلف پوسته تخم مرغ در جیره‌های حاوی آفلاتوکسین باعث افزایش معنی‌دار شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و همچنین راندمان سنتز میکروبی نسبت به تیمار آفلاتوکسین شد که این افزایش در تیمار سطح ۲ پوسته تخم مرغ بیشترین مقدار بود به‌طوری‌که از این نظر بین تیمار حاوی سطح ۲ پوسته تخم مرغ و تیمارهای شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ٤- تأثیر پودر پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین بر فراسنجه‌های تخمیر در جیره‌های آلوده به آفلاتوکسین B_1 شرایط آزمایشگاهی[۱]

Table 4- Effect of egg shell powder as Aflatoxin binder on fermentation parameters of diets contaminated with aflatoxin B_1 *in vitro*[1]

مورد Case	تیمارهای آزمایشی[۲] Experimental treatments[2]						میانگین اشتباه استاندارد SEM	سطح معنی‌داری p-value
	شاهد بدون متانول Control without methanol	شاهد با متانول control with methanol	آفلاتوکسین Aflatoxin	سطح ۱پوسته تخم مرغ Egg shell level 1	سطح ۲پوسته تخم مرغ Egg shell level 2	سطح ۳پوسته تخم مرغ Egg shell level 3		
انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) ME ($MJ\ kg^{-1}$ of DM)	9.15^{a}	8.67^{ab}	7.62^{c}	7.81^{c}	8.47^{b}	7.39^{c}	0.051	0.001
انرژی خالص شیردهی (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) NE_L (MJ per kg DM)	5.19^{a}	5.47^{a}	4.54^{b}	4.83^{b}	5.27^{a}	4.26^{b}	0.172	0.001
قابلیت هضم ماده آلی (درصد) DOM (%)	57.26^{a}	59.65^{a}	50.62^{b}	49.48^{b}	56.01^{a}	49.16^{b}	2.512	0.001
اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول/گرم ماده خشک) SCFA ($mmol\ g^{-1}$ of DM)	1.044^{a}	1.09^{a}	0.89^{b}	0.88^{b}	1.026^{a}	0.83^{b}	0.052	0.001
ازت آمونیاکی (میلی‌گرم/ دسی لیتر) N-NH3 (mg/ dl)	19.02^{a}	20.72^{b}	23.57^{c}	21.03^{b}	20.31^{ab}	20.53^{b}	0.42	0.001

[۱] تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

[۲] تیمارها شامل: تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه)، سطح۱ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۷ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، سطح۲ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۷۵ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، سطح۳ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۱۵۰ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک).

[1] Means within the same row with different superscripts differ (P< 0.05).

[2] Treatments consist of, control with methanol, control without methanol, Aflatoxin (800 ng/mg of rumen fluid), egg shell powder level 1 (Aflatoxin+ 7mg egg shell powder /200 mg of diet), egg shell level 2 (Aflatoxin +75mg egg shell powder /200 mg of diet), egg shell level 3 (Aflatoxin + 150 mg egg shell powder /200 mg of diet).

از طرفی سطح ۱ پوسته تخم مرغ نیز باعث بهبود معنی‌دار در شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و همچنین راندمان سنتز میکروبی نسبت به تیمار آفلاتوکسین گشت ولی این افزایش نسبت به تیمارهای شاهد به‌طور معنی‌داری کمتر بود که نشان از سطح ناکافی پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین در تیمار این تیمار آزمایشی است. در تیمار حاوی سطح ۳ پوسته تخم مرغ نیز شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و همچنین راندمان سنتز میکروبی نسبت به تیمار آفلاتوکسین به‌طور معنی‌داری بالاتر بود از طرفی، پارامترهای توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی نسبت به تیمارهای شاهد و تیمار سطح ۲ پوسته تخم مرغ به‌طور معنی‌داری کمتر بود که گویای تأثیر منفی سطح بالای جاذب آفلاتوکسین در این تیمار است که تأثیر خود را در کاهش قابلیت هضم ماده آلی، سنتز اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (جدول ۴) نیز نشان داده است. به‌طوری‌که تحقیقات جیانگ و همکاران نشان داده است که راندمان جذب آفلاتوکسین در جیره‌های حاوی ماده جاذب توکسین وابسته به دوز آفلاتوکسین و مقادیر ماده جاذب مورد استفاده در جیره غذایی گاوهای شیری است و افزودن بیش از حد جاذب آفلاتوکسین با از دسترس خارج کردن مواد مغذی و معدنی مانع از هضم و جذب بهینه آن‌ها می‌شود که در این آزمایش نیز به نظر می‌رسد تأثیر منفی سطح ۳ پوسته تخم مرغ بر قابلیت هضم ماده آلی، توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی نسبت به سطح ۲ پوسته تخم مرغ بدلیل سطح بالای این افزودنی باشد (۱۳).

جدول۵- تأثیر سطوح مختلف پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب توکسین در جیره دامی حاوی آفلاتوکسین بر شاخص تفکیک‌پذیری و توده میکروبی تولیدی میکروارگانیسم‌های شکمبه گوسفند در شرایط آزمایشگاهی[1]

Table 5- Effect of different levels of egg shell as toxin binder in the rations containing aflatoxin on partitioning factor and microbial mass of ruminal microorganisms of sheep *in vitro*[1]

مورد Case	تیمارهای آزمایشی[2] Experimental treatments[2]						میانگین اشتباه استاندارد SEM	سطح معنی‌داری p-value
	شاهد بدون متانول Control without methanol	شاهد با متانول control with methanol	آفلاتوکسین Aflatoxin	سطح ۱پوسته تخم مرغ egg shell level 1	سطح ۲پوسته تخم مرغ egg shell level 2	سطح ۳پوسته تخم مرغ egg shell level 3		
عامل تفکیک (میلی‌گرم ماده آلی در میلی لیتر گاز) PF (mg of OM ml $^{-1}$ of Gas)	3.49^{ab}	3.28^{ab}	2.35^{c}	2.96^{b}	3.62^{a}	3.12^{ab}	0.162	0.001
توده میکروبی تولیدی (میلی‌گرم) Microbial mass (mg)	50.82^{a}	50.35^{a}	4.77^{d}	14.15^{c}	44.48^{a}	26.80^{b}	2.70	0.001
راندمان سنتز میکروبی (درصد) Efficiency of microbial synthesis (%)	27.47^{a}	27.22^{a}	2.58^{d}	7.65^{c}	24.04^{a}	14.49^{b}	1.459	0.001

[1] تیمارها با حروف متفاوت از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۵ تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

[2] تیمارها شامل: تیمار شاهد بدون متانول، شاهد حاوی متانول، آفلاتوکسین (۸۰۰ نانوگرم آفلاتوکسین در میلی‌لیتر مایع شکمبه)، سطح۱ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۷ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، سطح۲ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۷۵ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک)، سطح۳ پوسته تخم مرغ (آفلاتوکسین+ ۱۵۰ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ در ۲۰۰ میلی‌گرم خوراک).

[1] Means within the same row with different superscripts differ (P< 0.05).

[2] Treatments consist of, control with methanol, control without methanol, Aflatoxin (800 ng/mg of rumen fluid), egg shell powder level 1 (Aflatoxin+ 7mg egg shell powder /200 mg of diet), egg shell level 2 (Aflatoxin +75mg egg shell powder /200 mg of diet), egg shell level 3 (Aflatoxin + 150 mg egg shell powder /200 mg of diet).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده آفلاتوکسین B_1 در جیره غذایی باعث کاهش در تولید گاز، تجزیه‌پذیری ماده آلی، تجزیه‌پذیری ماده خشک و قابلیت هضم ماده آلی گشت که این کاهش معنی‌دار در اثر تأثیر منفی آفلاتوکسین بر جمعیت باکتریایی محیط کشت ارزیابی شده است که نتیجه آن کاهش معنی‌دار در شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تولیدی، انرژی قابل متابولیسم و انرژی خالص شیردهی بود. از طرفی با افزودن سطوح مختلف پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین بهبود در شرایط تخمیری مشاهده شد که این بهبود در استفاده از سطح ۲ پوسته تخم مرغ (۷۵ میلی‌گرم پوسته تخم مرغ) معنی‌دار بود. به‌طوری‌که بین سطح ۲ پوسته تخم مرغ به عنوان جاذب آفلاتوکسین و تیمارهای شاهد فاقد آفلاتوکسین تفاوت معنی‌داری در فراسنجه‌های تخمیری، تولید گاز، شاخص تفکیک‌پذیری، توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با در نظر گرفتن مجموعه نتایج حاصل می‌توان پوسته تخم مرغ را به عنوان جاذب آفلاتوکسین در شرایط شکمبه‌ای مدنظر قرار داد و به‌منظور کاهش تأثیرات منفی آفلاتوکسین B_1 بر فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده مواد غذایی در شرایط شکمبه‌ای پیشنهاد داد.

منابع

1. Abdulrazak, S. A., J. Nyangaga., and T. Fujihara. 2001. Relative palatability to sheep of some browse species, their *in sacco* degradability and *in vitro* gas production characteristics. Asian-Australasian Journal of Animal Science, 14(11) 1580–1584.
2. Akhtar, S., M. A. Shahzad., S. H. Yoo., and A. Ismail. 2017. Determination of aflatoxin M1 and heavy metals in infant formula milk brands available in Pakistani markets. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 37(1) 79–86.
3. Assadzadeh, S., A. Tahmasbi., A. A. Naserian., and R. Valizadeh. 2018. The effect of organic and inorganic aflatoxin B_1 absorbents on *in vitro* digestibility and rumen fermentation characteristics. Iranian Journal of Animal Science Research, 9(4) 413–423.
4. Cassel, E., B. Campbell., M. Draper., and B. Epperson. 2001. Aflatoxins hazards in grain (Aflatoxicosis and Livestock).South Dakota State University Extention.
5. Elliott, C. T., L. Connolly., and O. Kolawole. 2020. Potential adverse effects on animal health and performance caused by the addition of mineral adsorbents to feeds to reduce mycotoxin exposure. Mycotoxin Research, 36(1) 115–126.
6. Gallo, A., G. Giuberti., J. C. Frisvad., T. Bertuzzi., and K. F. Nielsen. 2015. Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. Toxins, 7(8) 3057–3111.
7. Getachew, G., H. P. S. Makkar., and K. Becker. 2002. Tropical browses: Contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. Journal of Agricultural Science, 139(3) 341–352.
8. Gurung, N. K., D. L. Rankins., and R. A. Shelby. 1999. *In vitro* ruminal disappearance of fumonisin B_1 and its effects on *in vitro* dry matter disappearance. Veterinary and Human Toxicology, 41(4) 196–199.
9. Hall, M. B., T. D. Nennich., P. H. Doane., and G. E. Brink. 2015. Total volatile fatty acid concentrations are unreliable estimators of treatment effects on ruminal fermentation in vivo. Journal of Dairy Science, 98(6) 3988–3999.
10. Helferich, W. G., R. L. Baldwin., and D. P. H. Hsieh. 1986. Aflatoxin B_1 metabolism in lactating goats and rats. Journal of Animal Science, 62(3) 697–705.
11. Jeong, J., J. Lee., Y. Simizu., and H. Tazaki. 2010. Effects of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on *in vitro* rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology, 162(3–4) 144–148.
12. Jiang, Y. H., H. J. Yang., and P. Lund. 2012. Effect of aflatoxin B_1 on *in vitro* ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. Animal Feed Science and Technology, 175(1–2) 85–89.
13. Jiang, Y., I. M. Ogunade., D. H. Kim., and X. Li. 2018. Effect of adding clay with or without a Saccharomyces cerevisiae fermentation product on the health and performance of lactating dairy cows challenged with dietary aflatoxin B_1. Journal of Dairy Science, 101(4) 3008–3020.
14. Jouany, J., and A. Yiannikouris. 2009. Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. Options Mediterraneennes, 85(1) 205–224.
15. Kotinagu, K., T. Mohanamba., and L. Rathna Kumari. 2015. Assessment of aflatoxin B_1 in livestock feed and feed ingredients by high-performance thin layer chromatography. Veterinary World, 8(12) 1396–1399.
16. Makkar, H. P. S. 2004. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resoures. In Assessing quality and safety of animal feeds. 55–88.
17. Mauricio, R. M., F. L. Mould., M. S. Dhanoa., E. Owen., K. S. Channa., and M. K. Theodorou. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. Animal Feed Science and Technology, 79(1) 321–330.
18. Menke, K. H., L. Raab., A. Salewski., H. Steingass., D. Fritz., and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. The Journal of Agricultural Science, 93(1) 217–222.
19. Menke, K., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. animal research, 287–55.
20. Mojtahedi, M. 2013. Effect of aflatoxin B_1 on *in vitro* rumen microbial fermentation responses using batch culture.

Annual review & Research in Biology, 3(4) 686–693.
21. Nemati, Z., H. Janmohammadi., A. Taghizadeh., H. Maleki Nejad., and Gh. Mogaddam. 2015. Effect of Bentonite as a natural adsorbent to ameliorate the adverse effects of aflatoxin B_1 on performance and immune systems in broiler chicks. Animal Production Research, 4(3) 67–78.
22. Nemati, Z., A. Karimi., and M. Besharati. 2015. Impact of aflatoxins contaminating feed and yeast cell wall supplementation on immune system in broiler chickens. International Conference on Innovations in Chemical & Agricultural Engineering, 14–17.
23. Nemati, Z., and R. Safari. 2020. Effect of activated charcoal on the fermentation parameters and degradability of contaminated diet with aflatoxin B_1 by microorganisms isolated from rumen *in vitro* condition. Research On Animal Production, 11(29) 27–29.
24. Nemati, Z., R. Safari., N. Kamrani., M. Sheikhlou., and M. Besharati. 2020. Effect of Aflatoxin B_1 on *In Vitro* Digestibility and Ruminal Fermentation of Sheep Diet. Research On Animal Production, 11(28) 75–83.
25. Orskov, E. R., and I. Mcdonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. The Journal of Agricultural Science, 92(2) 499–503.
26. Park, H. J., J. Seong Wook., Y. Jae Kyu., K. Boo Gil., and L. Seung Mok. 2007. Removal of heavy metals using waste eggshell. Journal of Environmental Sciences, 19(12) 1436–1441.
27. Reynal, S. M., I. R. Ipharraguerre., M. Liñeiro., and A. F. Brito. 2007. Omasal flow of soluble proteins, peptides, and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminai degradabilities. Journal of Dairy Science, 90(4) 1887–1903.
28. Safari, R., Z. Nemati., N. Kamrani., and A. Karimi. 2020. Effect of diatoms on the fermentation parameters and digestibility of contaminated diet with aflatoxin B_1 by microorganisms isolated from rumen *in vitro* condition. Journal of Veterinary Microbiology, 16(1) 50–60.
29. SAS. 2002. SAS User's Guide. 9.1 Edition. Statistics SAS Institute, Cary, NC, U.
30. Souza, N. K. P., E. Detmann., S. C. Valadares Filho., V. A. C. Costa., D. S. Pina., D. I. Gomes., A. C. Queiroz., and H. C. Mantovani. 2013. Accuracy of the estimates of ammonia concentration in rumen fluid using different analytical methods. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 65(6) 1752–1758.
31. Tapia, M. O., M. D. Stern., A. L. Soraci., and R. Meronuck. 2005. Patulin-producing molds in corn silage and high moisture corn and effects of patulin on fermentation by ruminal microbes in continuous culture. Animal Feed Science and Technology, 119(3–4) 247–258.
32. Udomkun, P., A. N. Wiredu., M. Nagle., J. Müller., B. Vanlauwe., and R. Bandyopadhyay. 2017. Innovative technologies to manage aflatoxins in foods and feeds and the profitability of application – A review. Food Control, 76 127–138.
33. Varadyova, Z., M. Baran., and I. Zelenak. 2005. Comparison of two *in vitro* fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. Animal Feed Science and Technology, 123 81–94.
34. Vercoe, P. E., H. P. S. Makkar., and A. C. Schlink. 2010. *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies. Springer Netherlands.
35. Westlake, K., R. I. Mackie., and M. F. Dutton. 1989. *In vitro* metabolism of mycotoxins by bacterial, protozoal and ovine ruminal fluid preparations. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 25 169–178.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 1, Spring 2021, p. 109-122

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰، ص. ۱۲۲-۱۰۹

Effect of Different Levels of Egg Shell Powder on Gas Production, Fermentation Parameters and Digestibility of Aflatoxin B_1 Contaminated Diet *in vitro*

Rashid Safari[1]*, Zabih alah Nemati[2], Mohamad Reza Sheikhlou[1]
Submitted: 23-07-2020
Accepted: 25-01-2021

Introduction Mycotoxins are secondary metabolites of fungi that are produced under stress condition. Aflatoxin is one of several extremely toxic, mutagenic and carcinogenic compounds produced by *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Parasiticus*. Numerous agricultural commodities such as Forages, cereal grains, oilseeds, and cotton seeds are potential sources of aflatoxins in ruminant diets. Many studies indicate that ruminants, like other animals, are affected by aflatoxins. Aflatoxin B_1 reduces ruminal digestion, animal production, and in high doses causes liver damage and death in ruminants. Several chemical, biological, and physical strategies developed in order to, detoxification of aflatoxins or minimizing the production of aflatoxins and inhibiting the absorption of them in the gastrointestinal tract. Recently, many researchers are focused on aflatoxin adsorbents to reduce the bioavailability of aflatoxins in the diet. Eggshell has a porous structure and on the other hand has significant amounts of pure calcium carbonate, which has the ability to absorb toxins. Due to limit information on the ability of egg shell powder to absorb aflatoxin, the present study was designed to investigate the effect of adding egg shell powder as toxin binder in diets containing aflatoxin B_1 on fermentation parameters and ruminal digestibility and gas production *in vitro*.

Materials and Methods To produce the aflatoxin required for the experiment, a standard strain of *Aspergillus Parasit*icus NRLL 2999 used and cultured on potato dextrose agar. In other to obtain proper amount of Aflatoxin, 2 ml of spore suspension with a concentration of 6.5×10^6 grown fungi was prepared and added to a flask containing sterile culture medium. After 5 days, the culture medium was dried in an oven. Culture medium contained of 250.9 mg/kg aflatoxin B_1. This experiment was performed in a completely randomized design with 5 treatments and 4 replications in each treatment. Experimental treatments consist of , control with methanol, control without methanol, Aflatoxin (800 ng/mg of rumen fluid), Aflatoxin+ level 1 egg shell powder (7 mg per 200 mg of diet), Aflatoxin +level 2 egg shell powder(75 mg per 200 mg of diet), Aflatoxin +level 3 egg shell powder(150 mg per 200 mg of diet). Rumen fluid was collected before the morning feed from three fistulated Moghani male sheep with 46 ± 3 kg live weight. Sheep fed with basal diet used in this experiment at a concentration of 50:50 forage to concentrate for 15 days before rumen fluid collection. *In vitro* gas production was measured in 4 replicates with 200 mg DM for each. The bottles were filled with 30 ml of incubation medium that consisted of 10 ml of rumen fluid plus 20 ml of buffer solution and placed in a water bath at 39 °C. Gas production was recorded at 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 h. Gas values corrected for blank incubation. The gas production and rate of gas production measured through 96 h incubation. A procedure similar to gas production with 4 replicates for each treatment was used for rumen batch culture system to measure NH3-N and *in vitro* digestibility after 24 h incubation. Contents of each glass bottle were

1- Assistant Professor of Animal Science Department, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2- Associate Professor of Animal Science Department, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
(* Corresponding author: Email: rashid.safari@gmail.com.)
Doi:10.22067/ijasr.2021.38309.0

filtered through three layers of cheesecloth and rumen fluid used to determination of NH3-N using the distillation method. Finally, all remaining contents oven dried at 60 °C for 48 h and analyzed for IVDMD and IVOMD. Metabolizable energy (ME), net energy for lactation (NE_L), short chain fatty acids (SCFA), partitioning factor (PF), Microbial mass and Efficiency of microbial synthesis calculate throughout 24h incubation.

Results and Discussion Results indicate a significant decrease in GP in aflatoxin treatment compared to treatments without aflatoxin, so that the amount of gas production decreased from 295.05 and 294.38 in control with methanol and control without methanol to 228.48 ml/g of DM. This change in GP was associated with significant reduction in IVDMD and IVOMD, ME, NE_L, SCFA, PF, microbial mass and Efficiency of microbial synthesis. Addition of different levels of egg shell powder as aflatoxin binder improved fermentation conditions which was significant in level 2 treatment compare to aflatoxin treatment. There was no significant difference in GP, IVDMD and IVOMD, ME, NE_L, SCFA, PF, microbial mass and efficiency of microbial synthesis between control treatments and level 2 egg shell powder as toxin binder.

Conclusion Considering all the results of experiment, egg shell could be considered as an adsorbent of aflatoxin in ruminal conditions. Egg shell powder suggested as toxin binder to reduce the negative effects of aflatoxin B_1 on microbial activity and degradability in ruminal conditions.

Keywords: Aflatoxin, Digestibility, Egg Shell, Gas production, Partitioning Factor.